

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-248578

(43)Date of publication of application : 22.09.1998

(51)Int.Cl.

C12N 15/09  
C07H 21/04  
C12N 1/21  
// (C12N 15/09  
C12R 1:01 )  
(C12N 1/21  
C12R 1:01 )

(21)Application number : 09-065618

(71)Applicant : NITTO CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 05.03.1997

(72)Inventor : MIZUMURA YURIE  
TO FUJIO

## (54) EXPRESSION VECTOR FOR BACTERIUM OF GENUS RHODOCOCOCCUS

## (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a general-purpose expression vector for a bacterium of the genus Rhodococcus, containing a mutant type regulatory factor having actions on constituent activation of a nitrilase gene promoter and capable of highly expressing the objective gene.

SOLUTION: This expression vector for a bacterium of the genus Rhodococcus comprises a DNA region capable of coding a regulatory factor having actions on the activation of a nitrilase gene promoter, a nitrilase promoter gene DNA region undergoing the activation by the regulatory factor, a DNA region capable of proliferating in the bacterium of the genus Rhodococcus and a drug-resistant DNA region capable of functioning in the bacterium of the genus Rhodococcus. An exogenote is integrated into the expression vector for the bacterium of the genus Rhodococcus and made to coexist in the bacterial cell of the genus Rhodococcus to thereby enable the constituent expression of the exogenote.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

01.03.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-248578

(43) 公開日 平成10年(1998) 9月22日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 N 15/00

Z N A A

C 0 7 H 21/04

C 0 7 H 21/04

B

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 1/21

// (C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 R 1:01)

審査請求 未請求 請求項の数 7 F D (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平9-65618

(22) 出願日

平成9年(1997) 3月5日

(71) 出願人 000003953

日東化学工業株式会社

東京都千代田区丸の内1丁目5番1号

(72) 発明者 水村 由利江

神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 日

東化学工業株式会社中央研究所内

(72) 発明者 湯 不二夫

神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 日

東化学工業株式会社中央研究所内

(54) 【発明の名称】 ロドコッカス属細菌用発現ベクター

(57) 【要約】

【解決手段】 ニトリラーゼ遺伝子プロモーターを活性化作用をもつ調節因子をコードするDNA領域、該調節因子により活性化を受けるニトリラーゼ遺伝子プロモーターDNA領域、ロドコッカス属細菌細胞内で増殖可能なDNA領域およびロドコッカス属細菌において機能する薬剤耐性DNA領域を含んでなるロドコッカス属細菌用発現ベクター。

【効果】 ロドコッカス属細菌用発現ベクターに外来遺伝子を組み込みロドコッカス属菌体内に共存させることにより、構成的に外来遺伝子の発現を可能にせしめる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記(1)～(4)のDNA領域を含んでなるロドコッカス (*Rhodococcus*) 属細菌用発現ベクター。

(1) ニトリラーゼ遺伝子プロモーターを活性化作用をもつ調節因子をコードするDNA領域

(2) (1) の調節因子により活性化を受けるニトリラーゼ遺伝子プロモーターDNA領域

(3) ロドコッカス属細菌細胞内で増殖可能なDNA領域

(4) ロドコッカス属細菌において機能する薬剤耐性DNA領域

【請求項2】 調節因子が配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチドおよび配列番号2のアミノ酸配列を有するポリペプチドの2成分より構成される請求項1記載の発現ベクター。

【請求項3】 ポリペプチドをコードする遺伝子が配列番号3および配列番号4の塩基配列を有する請求項2記載の発現ベクター。

【請求項4】 ロドコッカス属細菌細胞内で複製増殖可能なDNA領域がプラスミドpRC001、pRC002、pRC003およびpRC004からなる群から選ばれた少なくとも1種のプラスミド由来である請求項1記載の発現ベクター。

【請求項5】 薬剤耐性DNA領域がトランスポゾンTN903由来のカナマイシン耐性遺伝子からなる請求項1記載の発現ベクター。

【請求項6】 請求項1～5に記載の発現ベクターにニトリルヒドラーゼ遺伝子を組み込んだ組換え体プラスミド。

【請求項7】 請求項6記載の組換え体プラスミドにより形質転換されたロドコッカス属に属する微生物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は構成的に外来遺伝子の発現を可能とするロドコッカス (*Rhodococcus*) 属細菌用発現ベクターに関する。詳しくは、ニトリラーゼ遺伝子プロモーターを活性化作用をもつ調節因子をコードするDNA領域、調節因子により活性化を受けるニトリラーゼ遺伝子プロモーターDNA領域、ロドコッカス属細菌内で複製可能なDNA領域および薬剤耐性遺伝子を含むDNA領域を含有する発現ベクター、ならびにこの発現ベクターにニトリルヒドラーゼ遺伝子を組み込んだプラスミドにより形質転換されたロドコッカス属に属する微生物に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 ロドコッカス属に属する微生物は、その物理的強度や酵素等を細胞内に多量蓄積する能力から、産業的に有用な微生物触媒として知られ、例えば、ニトリル類の酵素的加水または加水分解によるアミドまたは酸の生産等に利用されている(特開平2-470、特開平3-251192参照)。また、これらの酵素を含む微生物触媒

を、遺伝子組換えの方法によりさらに有用なものに改良する試みがなされている(特開平4-211379、特開平6-25296、特開平6-303971参照)。さらに、ロドコッカス属に属する微生物の遺伝子操作を効率的に押し進めるために、宿主ベクター系の開発が進められており、新規なプラスミドの探索(特開平4-148685、特開平4-330287、特開平7-255484、特開平 参照)やベクターの開発(特開平5-64589、特開平8-56669、*Journal of Bacteriology* 170, 638-645 (1988)、米国特許 4,920,054)などが行われている。

【0003】 本発明者らは、すでにロドコッカス エリスロポリス (*Rhodococcus erythropolis*) SK92株からニトリラーゼ遺伝子およびその調節遺伝子をクローン化し、複合プラスミドベクターpK4を用いてロドコッカス属体内での発現を可能とした(特開平8-173169参照)。さらに、ニトリラーゼ発現の構成化した変異株SK92-B1株の構成化に関わる変異調節因子をコードする遺伝子を誘導型ニトリラーゼ産生細菌内に導入することにより、誘導物質を添加することなくニトリラーゼを得ることを可能にした(特開平9-23832号公報参照)。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、これまでロドコッカス属の汎用的な発現ベクターは知られておらず、遺伝子を高発現させるのための新しいベクターの開発が望まれていた。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】 かかる状況下、鋭意検討を行った結果、本発明者らは、ニトリラーゼ遺伝子プロモーターを構成的に活性化作用を有する変異型調節因子を含む汎用的で且つ目的とする遺伝子を高発現させるロドコッカス細菌用発現ベクターを見出し、本発明を完成するに至った。

## 【0006】 すなわち、本発明は、

1) 下記(1)～(4)のDNA領域を含んでなるロドコッカス (*Rhodococcus*) 属細菌用発現ベクター、

(1) ニトリラーゼ遺伝子プロモーターを活性化作用をもつ調節因子をコードするDNA領域

(2) (1) の調節因子により活性化を受けるニトリラーゼ遺伝子プロモーターDNA領域

(3) ロドコッカス属細菌細胞内で増殖可能なDNA領域

(4) ロドコッカス属細菌において機能する薬剤耐性DNA領域

2) 上記発現ベクターにニトリルヒドラーゼ遺伝子を組み込んだ組換え体プラスミド、ならびに、

3) 上記組換え体プラスミドにより形質転換されたロドコッカス属に属する微生物、に関する。

## 【0007】

【発明の実施の形態】 以下に、本発明を詳細に説明する。なお、本発明の調節因子はロドコッカスエリスロポリ

リス (*Rhodococcus erythropolis*) SK92株の変異株 SK92-B1株由来のものであるが、SK92株由来の調節因子を用いることにより、誘導型の発現ベクターにすることができる。

【0008】SK92-B1株は *R. erythropolis* SK92-B1 (FERM P-14853)、SK92株は *Rhodococcus* sp. SK92 (FERM BP-3324) として、それぞれ工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。その他、以下に説明するプラスミド等は以下のとおりである。すなわち、SK92株由来ニトリラーゼ遺伝子および調節遺伝子を含むプラスミド pSK106 はこれを含有する形質転換体 *E. coli* JM109/pSK106 (FERM P-14856)、SK92-B1株由来ニトリラーゼ遺伝子および調節遺伝子を含むプラスミド pBSK201 はこれを含有する形質転換体 *E. coli* JM109/pBSK201 (FERM P-14855)、複合プラスミドベクター pK4 はこれを含有する形質転換体 *R. rhodochrous* ATCC 12674/pK4 (FERM BP-3731)、ロドコッカス ロドクロウス J-1株のH型ニトリルヒドラターゼ遺伝子を含むプラスミド pNHJ10H はこれを含有する形質転換体 TG1/pNHJ10H (FERM BP-2777)、プラスミド pSJ023 は形質転換体 *R. rhodochrous* ATCC12674/pSJ023 (FERM P-16108) として、同じく工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。

#### 【0009】

【実施例】以下、実施例により詳細に説明する。ただし、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

#### 【0010】実施例1

1) 調節遺伝子をコードする遺伝子を含むプラスミドの作製

##### 1-1) DNA断片の作製

SK92株由来のプラスミド pSK106 の調節遺伝子をコードする遺伝子を含む領域 (約3 kb EcoRV断片) (特開平8-173169参照) を、SK92-B1株由来のプラスミド pBSK201 の調節遺伝子をコードする遺伝子を含む領域 (約3 kb EcoRV断片) とを置き換えたプラスミド pBSK302 (特開平9-23832参照) を制限酵素 SacI で切断後、7.3 kb の SacI断片を0.7%アガロース電気泳動により分離し、ゲルより切り出し回収した。10  $\mu$  l の pBSK302 に対し、10倍濃度制限酵素緩衝液10  $\mu$  l、滅菌水78  $\mu$  l、制限酵素 SacI 2  $\mu$  l を加え37℃にて2時間反応させた。ベクターに用いた pUC118断片は次のように作製した。10  $\mu$  l の pUC118 に対し10倍濃度制限酵素緩衝液10  $\mu$  l、滅菌水77  $\mu$  l、制限酵素 SacI 2  $\mu$  l を加え37℃で2時間反応後、フェノール処理、エタノール沈澱させた後乾燥して50  $\mu$  l の滅菌水に溶解した。さらに、アルカリフォスタファー

ゼ (宝酒造株式会社) 1  $\mu$  l、10倍濃度緩衝液10  $\mu$  l、滅菌水39  $\mu$  l を加え65℃で反応後フェノール処理、エタノール沈澱を行い乾燥して滅菌水に溶解した。

7.3 kb断片を含むDNA断片画分1  $\mu$  l を、上記のように調製した SacI 切断 pUC118 とライゲーションキット (宝酒造株式会社) を用いて4℃で一晩反応させることにより pUC118 への挿入を行った。

【0011】1-2) 形質転換体の作製および組換え体DNAの選別

大腸菌 JM109株をLB培地 (1.0%バクトトリプトン、0.5%バクトイーストエキス、0.5%NaCl) 1 ml に接種し37℃、5時間前培養し、この培養物100  $\mu$  l をSOB培地50 ml (2%バクトトリプトン、0.5%バクトイーストエキス、10 mMNaCl、2.5 mM KCl、1 mM MgSO<sub>4</sub>、1 mM MgCl<sub>2</sub>) に加え、18℃で20時間培養した。遠心により集菌した後、冷13 ml TF溶液 (20 mMPIPE-S-KOH (pH 6.0)、200 mM KCl、10 mM CaCl<sub>2</sub>、40 mM MnCl<sub>2</sub>) を13 ml 加え、0℃で10分放置後、再度遠心した。上澄を除いた後、沈澱した大腸菌に冷TF溶液3.2 ml に懸濁し0.22 ml のジメチルスルホキシドを加え0℃で10分間放置した。こうして作製したコンピテントセル200  $\mu$  l に工程1-1) で作製した組換え体プラスミドを含有する溶液 (DNAライブラリー) を10  $\mu$  l 加え、0℃で30分放置後、42℃で30秒間ヒートショックを与え0℃で2分間冷却後、SOC培地 (SOB培地に20 mM グルコースを加えたもの) を0.8 ml 加え37℃にて60分間振盪培養した。これを200  $\mu$  l ずつアンピシリン100  $\mu$  g/ml と1 mM のIPTG (イソプロピルーβ-チオガラクトシド) と0.3 mM のX-gal (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルーβ-D-ガラクトピラノシド) 含有のLB寒天培地にまき、37℃で培養した。寒天培地上に生育した形質転換体コロニーについて青色発色の有無により目的の組換え体の選択を行った。

##### 【0012】1-3) 組換え体プラスミドの調製

工程1-2) で選択した形質転換体を100 ml のLB培地にて37℃で一晩培養し、集菌後、滅菌水により洗浄し、溶液I (2 mM グルコース、10 mM EDTA、25 mM Tris·HCl (pH 8.0)) を5 ml、リゾチムを25 mg 加え、0℃で30分間放置した。溶液II (1 N NaOH、5% SDS) を10 ml 加え0℃で5分間放置し、溶液III (3 M 酢酸ナトリウム (pH 4.8)) を7.5 ml 加え0℃で30分間放置した。これを遠心し、その上澄みに50 ml のエタノールを加えさらに遠心し上清を取り除き5 ml の溶液IV (10 mM 酢酸ナトリウム、50 mM Tris·HCl (pH 8.0)) とリボヌクレアーゼA溶液 (10 mg/ml) を2.5  $\mu$  l 加え室温で20分間放置した。これに12 ml のエタノール

を加え遠心後沈殿したプラスミドを乾燥し滅菌水で溶解した。こうして得られたプラスミドをpBSK305と命名した。

【0013】2) ニトリラーゼ遺伝子プロモーター下流へニトリルヒドラターゼ遺伝子を含む領域が導入された、ロドコッカス属において複製可能な組換え体プラスミドの作製

工程1)で作製したプラスミドpBSK305のニトリラーゼ遺伝子プロモーター下流にニトリルヒドラターゼ遺伝子を含む領域を導入し、さらに、ベクターをpK4 [FERM BP-3731:ロドコッカス属プラスミドpRC004と大腸菌ベクターpHSG299 (トランスポゾンTN903由来のカナマイシン耐性遺伝子を含む)を連結させたもの(特開平5-64589、特開平5-68566 参照)]としたプラスミドを作製した。プラスミドpBSK305を制限酵素XbaIとEcoRIで切断後、7.3 kbの断片を0.7%アガロース電気泳動により分離し、ゲルより切り出し回収した。10  $\mu$  lのpBSK305に対し、10倍濃度制限酵素緩衝液10  $\mu$  l、滅菌水76  $\mu$  l、制限酵素XbaIとEcoRIをそれぞれ2  $\mu$  l加え37℃にて2時間反応させた。

【0014】ベクターに用いたpK4断片は次のように作製した。10  $\mu$  lのpK4に対し10倍濃度制限酵素緩衝液10  $\mu$  l、滅菌水78  $\mu$  l、制限酵素EcoRI 2  $\mu$  lを加え37℃で2時間反応後、フェノール処理、エタノール沈殿させた後乾燥して50  $\mu$  lの滅菌水に溶解した。さらに、アルカリフォスタファーズ(宝酒造株式会社)1  $\mu$  l、10倍濃度緩衝液10  $\mu$  l、滅菌水39  $\mu$  lを加え65℃で反応後フェノール処理、エタノール沈殿を行い乾燥して滅菌水に溶解した。

【0015】J-1株H型ニトリルヒドラターゼ遺伝子を含む6.0 kb DNA断片がpUC19ベクターに組み込まれたプラスミドpNHJ10H [特開平4-21137 9, Biochim. Biophys. Acta 1129, 23-33(1991)参照]を制限酵素BamHIで、切断後セルフライゲーションしてプラスミドpFY702を作製した。これを制限酵素EcoRVで切断後、リンカーpXbaI (宝酒造株式会社)とライゲーションし、さらに制限酵素EcoRIで切断後ニトリルヒドラターゼ遺伝子を含む2.1 kbの断片を0.7%アガロース電気泳動により分離し、ゲルより切り出し回収した。7.3 kb断片1  $\mu$  lと、ニトリルヒドラターゼ遺伝子を含む2.1 kb断片1  $\mu$  lおよび、上記のXbaIとEcoRI切断pK4 1  $\mu$  lとをライゲーションキット(宝酒造株式会社)を用いて4℃で一晩反応させることによりプラスミドpSJ002を作製した(図1)。

【0016】3) ロドコッカス属細菌の形質転換および形質転換体のニトリルヒドラターゼ活性  
ロドコッカス ロドクロウス ATCC12674株の対数増殖期の細胞を遠心分離により集菌し、氷冷した滅

菌水にて3回洗浄し、滅菌水に懸濁した。1  $\mu$  lのプラスミドpSJ002と菌体懸濁液10  $\mu$  lを混合し、氷冷した。チャンバーにDNAと菌体の混合液を入れ、遺伝子導入装置CET-200型(日本分光)により電場強度3.8 kV/cm、パルス幅1 ms、パルス回数20回で電気パルス処理を行った。電気パルス処理液を氷冷下10分間静置し、37℃で、10分間ヒートショックを行い、MYK培地(0.5%ポリペプトン、0.3%バクトモルトエキス、0.3%バクトイーストエキス、0.2%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.2%K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.0)) 500  $\mu$  lを加え、26℃、3時間振盪培養した後、75  $\mu$  g/mlカナマイシン入りMYK寒天培地に塗布し26℃、3日間培養した。

【0017】こうして作製したロドコッカス属細菌組換え体(ATCC12674/pSJ002)をMYK培地(50  $\mu$  g/mlカナマイシン含有)10 mlに接種し、30℃で24時間前培養した。この培養物1 mlを培地100 ml(1.5%グルコース、0.1%バクトイーストエキス、1%グルタミン酸ナトリウム、0.05%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.05%K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.05%硫酸マグネシウム、0.01%塩化コバルト、pH 7.2、50  $\mu$  g/mlカナマイシン含有)に加え、30℃で60時間培養した。集菌後、この菌体を50 mMリン酸緩衝液(pH 7.7)に懸濁し、その一部を2.5%アクリロニトリルを含有する同緩衝液中で10℃、10分反応させた。1 N塩酸の添加により反応を止め、反応液中の生成アクリルアミドを高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。その結果、ロドコッカス属細菌組換え体ATCC12674/pSJ002において、44 mMのアクリルアミドの生成が認められた。

【0018】4) プラスミドpSJ023の作製  
pSJ002には、遺伝子発現に必要な領域がまだ多く残っているため、不要な領域を取り除いたプラスミドpSJ023を作製した。pSJ002を制限酵素EcoRIで部分分解後、さらにEcoRVで切断し末端平滑化処理をおこなった後、リンカーpEcoRI (宝酒造株式会社)とともにライゲーションを行い、プラスミドpSJ008を作製した。10  $\mu$  lのpSJ002に対し、10倍濃度制限酵素緩衝液10  $\mu$  l、滅菌水79.5  $\mu$  l、制限酵素EcoRI 0.5  $\mu$  lを加え37℃にて1時間反応させ、エタノール沈殿させた後乾燥して10  $\mu$  lの滅菌水に溶解した。さらにKlenow Fragment (宝酒造株式会社) 2  $\mu$  l、10倍濃度緩衝液10  $\mu$  l、滅菌水78  $\mu$  lを加え37℃で反応後フェノール処理、エタノール沈殿を行い乾燥して滅菌水10  $\mu$  lに溶解した。14.6 kbのDNA断片を0.7%アガロース電気泳動により分離し、ゲルより切り出し回収した。回収したDNA断片10  $\mu$  lに対し10倍濃度制限酵素緩衝液10  $\mu$  l、滅菌水78  $\mu$  l、制限酵素EcoRV 2  $\mu$  lを加え、2時間反応させ、フェノール処理、

エタノール沈殿を行った。次に、ライゲーションキット（宝酒造株式会社）を用いて、リンカー pEcoRI（宝酒造株式会社）と4℃で一晩反応させた。この溶液で形質転換された大腸菌よりプラスミド pSJ008 を得た。

【0019】また、プラスミド pBSK302 から調節遺伝子をコードする遺伝子を含む領域、約3 kb EcoRV断片を、0.7%アガロース電気泳動により分離し、ゲルより切り出し回収した。制限酵素による切断は、10 μl の pBSK302 に対し、10 倍濃度制限酵素緩衝液10 μl、滅菌水78 μl、制限酵素 EcoRV 2 μl を加え37℃にて2時間反応させることにより行った。この3 kb EcoRV断片1 μl を、EcoRI で切断した pUC118 とライゲーションキット（宝酒造株式会社）を用いて4℃で一晩反応させることにより pUC118 への挿入を行い、pBSK202 を作製した。プラスミド pBSK202 を制限酵素 EcoRI で切断後、3 kb断片を0.7%アガロース電気泳動により分離し、ゲルより切り出し回収した。

【0020】次に、プラスミド pSJ008 を制限酵素 EcoRI で部分分解後、さらにアルカリフォスタファゼ（宝酒造株式会社）でBAP処理を行い、8.72 kb断片を0.7%アガロース電気泳動により分離し、ゲルより切り出し回収した。これと pBSK202 由来の3 kb EcoRI断片とをライゲーションキット（宝酒造株式会社）を用いて4℃で一晩反応させることにより、プラスミド pSJ023 を作製した（図2）。

【0021】5) プラスミド pSJ023 を含むロドコッカス属細菌形質転換体のニトリルヒドラーゼ活性工程3)と同様にして、プラスミド pSJ023 のロドコッカス ロドクロウス ATCC12674 への導入を行い組み換え体（ATCC12674/pSJ023）を作製した。こうして作製したロドコッカス属細菌組換え体をMYK培地（50 μg/mlカナマイシン含有）10 ml に接種し、30℃で24時間前培養した。この培養物1 ml を培地100 ml（1.5%グルコース、0.1%バクトイーストエキス、1%グルタミン酸ナトリウム、0.05%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.05%K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.05%硫酸マグネシウム、0.01%塩化コバルト、pH 7.2、50 μg/mlカナマイシン含有）に加

え、30℃で60時間培養した。集菌後、この菌体を5

配列：

MetAlaGlyAlaAspValHisAlaGlnGlyGlyThrAsnArgArg	15
AlaArgIleLeuValValAspAspGluLysHisValArgThrMet	30
ValThrTrpGlnLeuGluSerGluAsnPheAspValValAlaAla	45
AlaAspGlyAspAlaAlaLeuArgGlnValThrGluSerAlaPro	60
AspLeuMetValLeuAspLeuSerLeuProGlyLysGlyGlyLeu	75
GluValLeuAlaThrValArgArgThrAspAlaLeuProIleVal	90
ValLeuThrAlaArgArgAspGluThrGluArgIleValAlaLeu	105
AspLeuGlyAlaAspAspTyrValIleLysProPheSerProArg	120

0 mMリン酸緩衝液（pH 7.7）に懸濁し、その一部を2.5%アクリロニトリルを含有する同緩衝液中で10℃、10分反応させた。1 N塩酸の添加により反応を止め、反応液中の生成アクリルアミドを高速液体クロマトグラフィーを用いて測定したところ40 mMのアクリルアミドの生成が認められた。

【0022】6) ロドコッカス属細菌用発現ベクターの作製

工程4)で作製したプラスミド pSJ023 からニトリルヒドラーゼ遺伝子を含む領域を取り除くことにより汎用的な発現ベクターを作製した。10 μl の pSJ023 に対し、10 倍濃度制限酵素緩衝液10 μl、滅菌水78 μl、制限酵素 XbaI 2 μl を加え37℃にて2時間反応させた。その後ライゲーションキット（宝酒造株式会社）を用いて4℃で一晩反応させた。次に、工程1-2)同様大腸菌 JM109 のコンピテントセルを作製し、この反応液を10 μl 加え、0℃で30分放置した。その後、42℃で30秒間ヒートショックを与え0℃で2分間冷却後、SOC培地を0.8 ml 加え37℃にて60分間振盪培養した。これを200 μl ずつカナマイシン100 μg/ml 含有のLB寒天培地にまき、37℃で培養した。寒天培地上に生育した形質転換体コロニーについて工程1-3)同様プラスミドの調製を行った。こうして得られたプラスミドを pRY01 と命名し、ロドコッカス属発現ベクターとした。

【0023】

【発明の効果】ロドコッカス属細菌用発現ベクターに外来遺伝子を組み込みロドコッカス属菌体内に共存させることにより、構成的に外来遺伝子の発現を可能にせしめる。

【0024】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：244

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：ロドコッカス エリスロポリス（*Rhodococcus erythropolis*）

株名：SK92-B1

9

10

GluLeuAlaAlaArgIleArgAlaValLeuArgArgThrThrAla 135  
 GluProProHisGluAlaAlaValGlnArgPheGlyAspLeuGlu 150  
 IleAspThrAlaAlaArgGluValArgLeuHisGlyIleProLeu 165  
 GluPheThrThrLysGluPheAspLeuLeuAlaTyrMetAlaAla 180  
 SerProMetGlnValPheSerArgArgArgLeuLeuLeuGluVal 195  
 TrpArgSerSerProAspTrpGlnGlnAspAlaThrValThrGlu 210  
 HisValHisArgIleArgArgLysIleGluGluAspProThrLys 225  
 ProThrIleLeuGlnThrValArgGlyAlaGlyTyrArgPheAsp 240  
 GlyGluArgAla 244

【0025】配列番号：2

配列の長さ：534

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

10 起源

生物名：ロドコッカス エリスロポリス (Rhodococcus  
 erythropolis)

株名：SK92-B1

MetMetThrAspThrLeuProSerSerSerArgTrpThrLeuGlu 15  
 GlyProHisLeuGlnProLeuGlnGlyGluAlaLeuAlaAspLeu 30  
 HisAlaArgThrLeuGluMetIleThrSerGlyArgGluLeuHis 45  
 GluThrLeuGluValValAlaArgGlyIleGluGluLeuMetPro 60  
 GlyLysArgCysAlaIleLeuLeuLeuAspAsnThrGlyProVal 75  
 LeuArgCysGlyAlaAlaProThrMetSerAlaProTrpArgArg 90  
 TrpIleAspSerLeuValProGlyProMetSerGlyGlyCysGly 105  
 ThrAlaValHisLeuGlyGluProValIleSerTyrAspValAla 120  
 AspAspProLysPheArgGlyProPheArgAlaAlaAlaLeuHis 135  
 GluGlyIleArgAlaCysTrpSerThrProValThrSerGlyAsp 150  
 GlyThrIleLeuGlyThrPheAlaIleTyrGlySerValProAla 165  
 PheProAlaGlnGlnAspValAlaLeuValThrGlnCysThrAsp 180  
 LeuThrAlaAlaValIleThrThrHisLysLeuHisGlnAspLeu 195  
 SerMetSerGluGluArgPheArgArgThrPheAspSerAsnVal 210  
 ValGlyMetAlaLeuLeuAspGluSerGlySerSerIleArgVal 225  
 AsnAspThrLeuCysAlaLeuThrAlaAlaProProArgArgLeu 240  
 LeuGlyHisProMetGlnGluIleLeuThrAlaAspSerArgGlu 255  
 ProPheAlaAsnGlnLeuSerSerIleArgGluGlyLeuThrAsp 270  
 GlyGlyGlnLeuAspGlyArgIleGlnThrThrGlyGlyArgTrp 285  
 IleProValHisLeuSerIleSerGlyMetTrpThrThrGluArg 300  
 GluPheMetGlyPheSerValHisValLeuAspIleSerGluArg 315  
 LeuAlaAlaGluArgAlaArgGluGluGlnLeuGluAlaGluVal 330  
 AlaArgHisThrAlaGluGluAlaSerArgAlaLysSerThrPhe 345  
 LeuSerGlyMetThrHisGluValGlnThrProMetAlaValIle 360  
 ValGlyPheSerGluLeuLeuGluThrLeuAspLeuAspGluGlu 375  
 ArgArgGlnCysAlaTyrArgLysIleGlyGluAlaAlaLysHis 390  
 ValIleSerLeuValAspAspValLeuAspIleAlaLysIleGlu 405  
 AlaGlyAlaIleThrLeuGlnAspGluAspIleAspLeuSerGlu 420  
 GluValAlaThrIleValGluMetLeuGluProIleAlaArgAsp 435  
 ArgAspArgAspValCysLeuArgTyrValProProGlnThrPro 450  
 ValHisValCysSerAspArgArgArgValArgGluValLeuLeu 465  
 AsnIleValSerAsnGlyIleLysTyrAsnArgLeuGlyGlyVal 480  
 ValAspProProThrGlySerGlyAlaAlaArgProArgGlnThr 495  
 ArgAlaProAspTyrProAlaThrProThrThrAsnSerSerSer 510  
 ProSerThrGlyTrpGluSerArgProArgGlyCysLysGlyArg 525

11

GlySerValLeuArgSerProAlaArg

12

534

【0026】配列番号：3

配列の長さ：735

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

\*起源

生物名：ロドコッカス エリスロポリス (Rhodococcus erythropolis)

株名：SK92-B1

\*

配列：

ATG GCC GGA GCG GAC GTC CAC GCC CAG GGT GGC ACG AAT CGA CGT	45
GCA CGC ATC CTC GTC GTC GAC GAC GAA AAA CAC GTG CGC ACG ATG	90
GTG ACG TGG CAA CTC GAA TCG GAG AAT TTC GAT GTT GTC GCT GCG	135
GCA GAC GGA GAT GCG GCA CTG CGT CAG GTC ACT GAG AGC GCA CCC	180
GAT TTG ATG GTG CTC GAT CTG TCG CTC CCG GGG AAA GGT GGG TTG	225
GAA GTG CTC GCT ACG GTC CGC AGA ACC GAT GCA CTG CCT ATC GTC	270
GTG CTC ACA GCA CGC CGC GAT GAA ACC GAA CGG ATC GTC GCG CTG	315
GAT CTC GGC GCC GAT GAC TAC GTC ATC AAA CCG TTC TCC CCG CGG	360
GAA TTG GCC GCC CGT ATC CGG GCA GTG CTT CGT CGA ACC ACA GCT	405
GAA CCC CCA CAC GAG GCG GCG GTT CAG CGA TTC GGT GAC CTA GAG	450
ATC GAC ACC GCT GCG CGC GAG GTT CGG CTC CAC GGG ATA CCG CTC	495
GAG TTC ACC ACC AAG GAG TTC GAT CTG CTG GCC TAT ATG GCC GCA	540
TCA CCG ATG CAG GTC TTC AGC CGA CGC AGA TTG TTG CTC GAG GTG	585
TGG CGA TCG TCG CCC GAC TGG CAG CAG GAC GCC ACC GTG ACC GAG	630
CAC GTG CAC CGC ATT CGC CGC AAG ATC GAA GAA GAT CCC ACC AAA	675
CCG ACG ATC CTG CAG ACA GTG CGG GGA GCC GGT TAC CGT TTC GAC	720
GGA GAG CGT GCA TGA	735

【0027】配列番号：4

配列の長さ：1605

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

起源

生物名：ロドコッカス エリスロポリス (Rhodococcus erythropolis)

株名：SK92-B1

配列：

ATG ATG ACC GAC ACA CTG CCC TCC TCG TCC CGT TGG ACC CTT GAA	45
GGC CCG CAT CTC CAG CCG CTG CAG GGT GAG GCC CTG GCG GAT CTC	90
CAC GCC CGT ACG CTC GAG ATG ATC ACT TCC GGG AGA GAA TTG CAC	135
GAG ACA CTC GAG GTG GTC GCC CGC GGC ATC GAG GAA CTG ATG CCG	180
GGC AAA CGT TGC GCA ATT CTG TTG CTC GAC AAC ACC GGA CCG GTA	225
TTG CGC TGC GGC GCG GCC CCA ACA ATG AGC GCG CCG TGG CGC CGG	270
TGG ATC GAC AGC CTC GTC CCT GGT CCG ATG TCG GGT GGC TGC GGC	315
ACA GCG GTT CAC CTC GGC GAG CCG GTT ATT TCC TAT GAC GTG GCC	360
GAT GAC CCG AAA TTC CGC GGC CCC TTC CGC GCC GCA GCC CTC CAC	405
GAG GGC ATA CGT GCC TGC TGG TCC ACC CCC GTC ACA AGC GGA GAC	450
GGC ACG ATC CTC GGC ACT TTC GCG ATC TAC GGA TCC GTG CCG GCG	495
TTC CCC GCA CAA CAG GAC GTT GCC CTG GTC ACC CAA TGC ACC GAC	540
CTG ACC GCT GCC GTC ATC ACC ACC CAC AAA CTT CAT CAA GAT CTG	585
AGC ATG AGC GAG GAG CGG TTC CGA CGC ACC TTC GAT TCC AAT GTC	630
GTC GGC ATG GCA CTT CTC GAC GAA TCC GGC TCC AGC ATC CGC GTC	675
AAC GAC ACC CTG TGC GCG TTG ACC GCA GCT CCG CCA CGG CGC CTC	720
CTC GGC CAC CCC ATG CAG GAG ATA CTC ACC GCC GAC TCC CGG GAA	765
CCG TTC GCC AAT CAG TTG TCC TCC ATC CGT GAG GGA TTG ACC GAC	810
GGC GGA CAG CTC GAC GGA CGA ATC CAA ACC ACC GGA GGT CGG TGG	855
ATT CCG GTG CAC CTG TCC ATC AGC GGT ATG TGG ACC ACG GAG CGG	900



13

GAG TTC ATG GGA TTC AGC GTC CAT GTC CTG GAC ATC TCC GAG CGC 945  
 CTG GCC GCC GAA CGC GCC CGC GAG GAA CAA CTC GAG GCC GAG GTT 990  
 GCC CGC CAT ACC GCG GAG GAA GCC AGT CGC GCC AAG TCC ACG TTC 1035  
 CTG TCC GGC ATG ACG CAC GAG GTC CAA ACG CCC ATG GCC GTT ATC 1080  
 GTC GGA TTC AGT GAG CTA CTC GAG ACG CTG GAC CTG GAT GAA GAA 1125  
 CGT CGT CAG TGC GCC TAC CGC AAG ATC GGC GAA GCC GCG AAA CAC 1170  
 GTG ATC TCC CTG GTC GAC GAC GTT CTC GAT ATA GCC AAG ATC GAA 1215  
 GCC GGC GCT ATC ACT CTG CAG GAC GAA GAC ATC GAC CTG TCC GAA 1260  
 GAA GTT GCC ACC ATC GTG GAG ATG CTC GAG CCC ATC GCC CGT GAC 1305  
 CGT GAC CGT GAC GTC TGC CTG CGG TAC GTC CCG CCG CAG ACA CCG 1350  
 GTG CAC GTG TGC TCG GAC CGG CGG CGG GTG CGG GAA GTG CTG CTC 1395  
 AAC ATC GTC TCC AAC GGG ATC AAG TAC AAT CGG CTC GGT GGT GTC 1440  
 GTC GAC CCC CCA ACA GGA TCA GGG GCT GCT CGT CCG CGT CAG ACG 1485  
 AGG GCC CCG GAC TAC CCA GCG ACG CCG ACG ACG AAC TCT TCG AGC 1530  
 CCT TCA ACC GGC TGG GAG TCG AGG CCA CGG GGG TGC AAG GGT CGG 1575  
 GGC TCG GTC TTG CGC TCT CCC GCG CGC TGA 1605

14

【 0 0 2 8 】

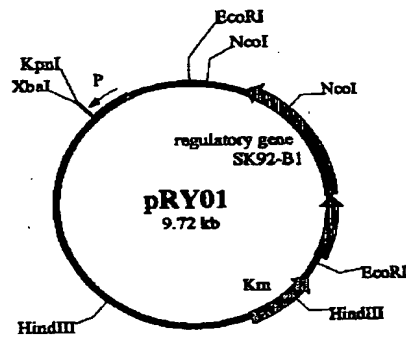
【図 2】組換え体 p S J 0 2 3 の作製図

【図面の簡単な説明】

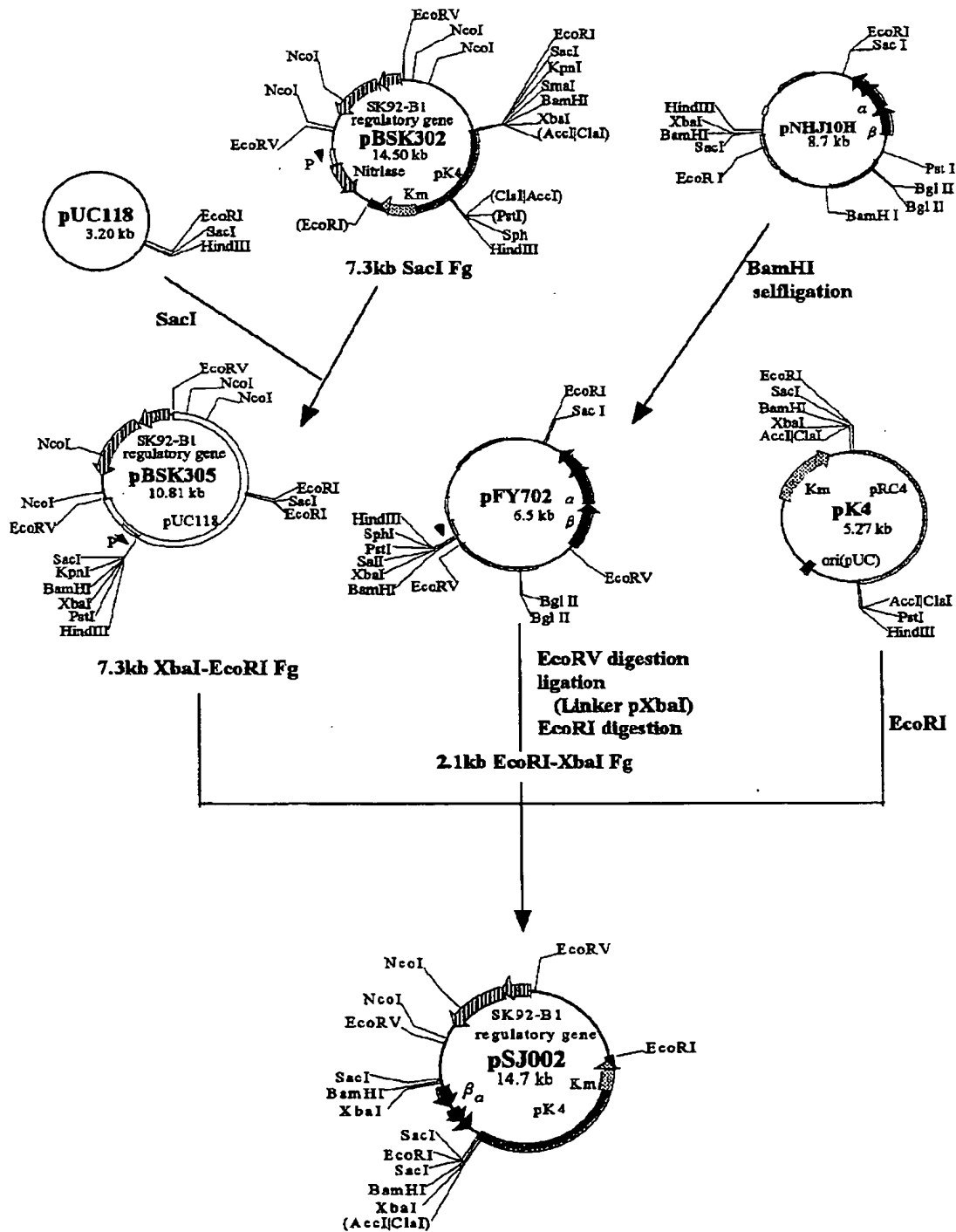
【図 3】発現ベクター p R Y 0 1 の制限酵素地図

【図 1】組換え体 p S J 0 0 2 の作製図

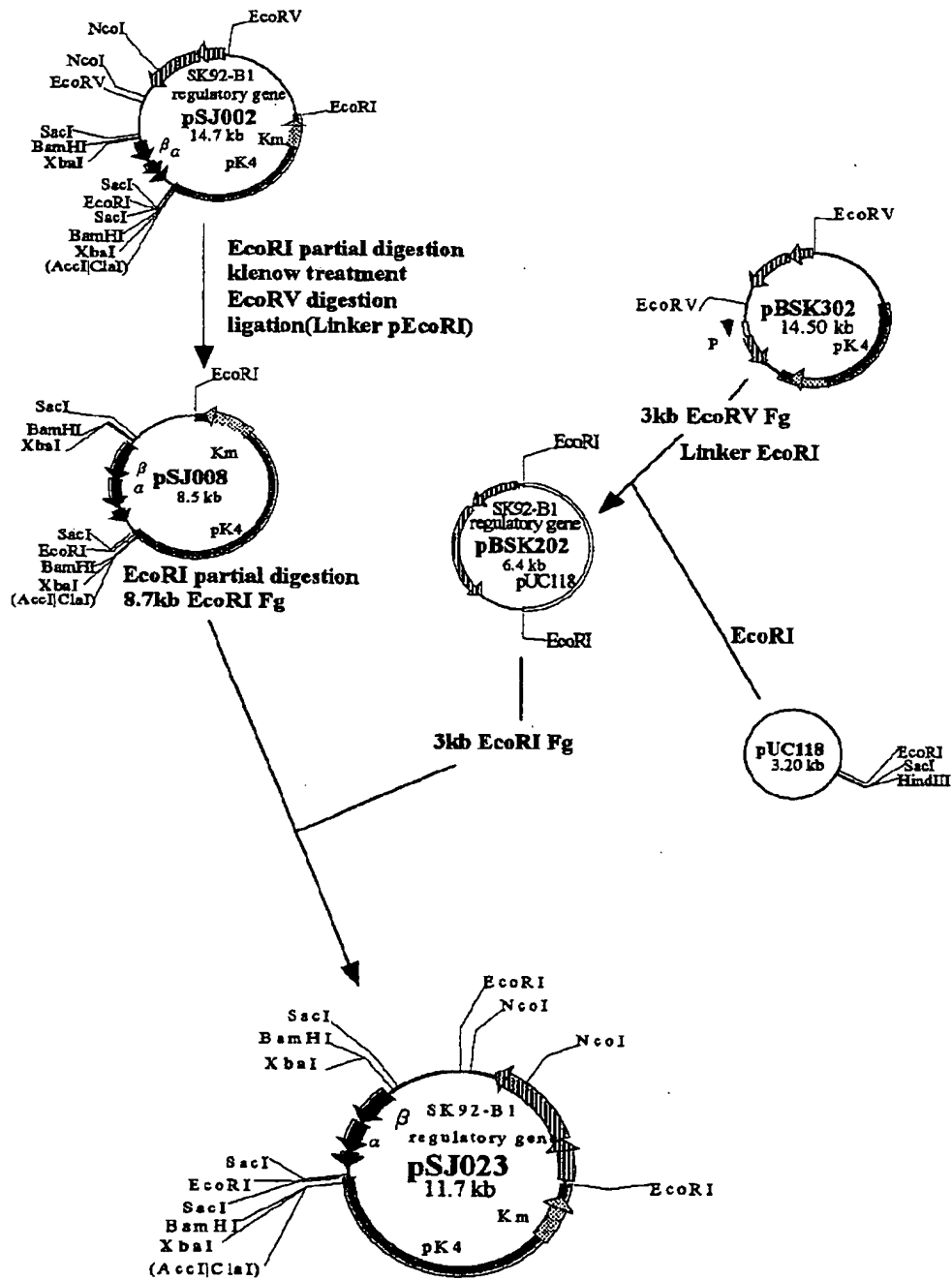
【図 3】



【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

識別記号

F I

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:01)